



Universidad
Zaragoza



Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón

Trabajo de Fin de Grado

Identificación de variantes polimórficas del
gen *SCARB1* en sujetos con dislipemia de
etiología desconocida

Identification of polymorphic variants of the
SCARB1 gene in subjects with
dyslipidemia of unknown etiology

Autora: Nadia Larumbe Chueca

Directoras:

Irene Gracia Rubio

Estíbaliz Jarauta Simón

Ponente: Jesús De La Osada García

Grado en Biotecnología. Curso 2020-21

DÑA. IRENE GRACIA RUBIO, Doctora en Biomedicina e Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón.

DÑA ESTÍBALIZ JARAUTA SIMÓN, Doctora en Medicina e Investigadora del Instituto Carlos III.

Codirectores de este Trabajo final de Grado,

CERTIFICAN

Que la Memoria del Trabajo Final de Grado titulado: “Identificación de variantes polimórficas del gen *SCARB1* en sujetos con dislipemia de etiología desconocida”, presentada por **DÑA. NADIA LARUMBE CHUECA**, ha sido realizada en la Unidad Clínica y de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Servet bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos del Trabajo final de Grado aprobado dentro del Grado de Biotecnología, reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Graduado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación.

Zaragoza, 24 de Junio de 2021.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ABCA1	Cassette de unión a ATP A1
ABCG1	Cassette de unión a ATP G1
ALT	Alanina transaminasa
ApoA-1	Apolipoproteína A-1
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosín trifosfato
CVD	Cardiovascular disease
DHCR24	3-beta-hidroxiesteroide-delta 24-reductasa
EC	Ésteres de colesterol
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa
GGT	Gamma glutamil transferasa
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDLc	Colesterol transportado en HDL
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IL-10	Interleuquina 10
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLc	Colesterol transportado en LDL
LIMP-2	Proteína lisosomal integral de membrana 2
Lp(a)	Lipoproteína a
NF- κ B	Factor nuclear κ B
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PDZK1	Proteína adaptadora con dominio de PDZ 1
RCT	Reverse colesterol transport
SR-B1	Receptor scavenger de clase B, tipo I
SR-B2 o	Receptor scavenger de clase B, tipo II
CD36	
TFG- β	Factor de crecimiento tisular β
TG	Triglicéridos
TM	Temperatura de melting
TRC	Transporte reverso de colesterol
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Introducción	2
3.1. Enfermedades cardiovasculares.....	2
3.2. El receptor SR-B1.....	2
3.3. SR-B1 en el metabolismo de las lipoproteínas.....	3
3.4. SR-B1 y su papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.....	4
3.5. Variantes genéticas de SR-B1	5
4. Objetivos.....	8
5. Materiales y métodos.....	8
5.1. Selección de sujetos.....	8
5.2. Parámetros clínicos y antropométricos	9
5.3. Análisis bioquímico	9
5.4. Obtención del DNA genómico.....	9
5.5. Diseño de cebadores.....	10
5.6. Amplificación por PCR del gen de estudio	11
5.7. Purificación del producto mediante Exosap-IT	12
5.8. Reacción de secuenciación	12
5.9. Análisis bioinformático	13
5.10. Análisis estadístico	13
6. Resultados.....	13
6.1. Características clínicas y bioquímicas	13
6.2. Variantes del gen <i>SCARB1</i>	15
7. Discusión	19
8. Conclusiones	21
9. Conclusions	22
10. Bibliografía.....	23

1. Resumen

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se han descrito como factores ateroprotectores, disminuyen el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (ECV) debido a su implicación en el transporte reverso de colesterol (TRC). En este transporte juega un papel fundamental el receptor scavenger de clase B, tipo I (SR-B1), de alta afinidad por las HDL que permite el eflujo del exceso de colesterol de los tejidos periféricos para su internalización en el hígado y su posterior excreción en forma de ácidos biliares. Dado que algunos polimorfismos del gen *SCARB1*, que codifica para este receptor, se han relacionado con las concentraciones plasmáticas de lípidos y con el riesgo de sufrir ECV, en este trabajo se seleccionaron 96 pacientes con niveles extremos de colesterol transportado por HDL (HDLc) y se analizó la relación entre las mutaciones encontradas en la secuencia del gen y el perfil lipídico de los pacientes. Al estudiar las características clínicas y bioquímicas de ambos grupos se observó que los pacientes con menor concentración de HDL tenían los niveles de colesterol LDL y total más reducidos, los niveles de triglicéridos y el índice de masa corporal eran significativamente mayores, así como el número de incidentes cardiovasculares ocurridos en este grupo. El análisis de los polimorfismos, encontró en total veinticinco variantes genéticas, cuatro de ellas con posibles efectos patogénicos: en el grupo con niveles de HDLc altos se encontró p.(Thr378Met) y dos polimorfismos no descritos previamente (c.-177G>T y p.(Thr118Ser)), mientras que en el grupo con menores concentraciones de HDLc se identificó c.843-982G>A. Por otra parte, el análisis comparativo de nuestros datos con las frecuencias alélicas establecidas para los polimorfismos en la población europea general muestra que cinco de las variantes identificadas en nuestro estudio aparecen con una mayor frecuencia en individuos con niveles extremos de HDL (p.(Gly2Ser), p.(Pro60=), p.(Ser129Leu), c.1255-41C>G y c.*1530+786G>A).

2. Abstract

High-density lipoproteins (HDL) have been described as atheroprotective factors that decrease the risk of cardiovascular disease (CVD) due to their involvement in the reverse cholesterol transport (RCT). In this transport plays a fundamental role the scavenger receptor of class B, type I (SR-B1), a lipoprotein receptor that allows the efflux of excess cholesterol from peripheral tissues for its uptake into the liver and its subsequent biliary excretion. Since some polymorphisms of the *SCARB1* gene, which encodes for this receptor, have been related to plasma lipid concentrations and the risk of CVD, in this project we selected 96 patients with extreme HDL levels and analyzed the relationship between mutations found in the gene sequence and the lipid profile of these patients. When studying the clinical and biochemical characteristics of both groups of subjects, it was observed that patients with lower HDL concentrations had the lowest LDL and total cholesterol levels, triglyceride levels and body mass index were significantly higher, as well as the number of cardiovascular incidents that occurred in this group. Regarding the analysis of polymorphisms, a total of twenty-five

genetic variants were found, four of them with possible pathogenic effects: in the group with high HDLc levels, we identified p.(Thr378Met) and two polymorphisms not previously described (c.-177G>T and p.(Thr118Ser)), while in the group with lower HDL concentrations we found c.843-982G>A. On the other hand, comparative analysis of our data with the allelic frequencies established for polymorphisms in the general European population shows that five of the variants identified in our study appear more frequently in individuals with extreme HDL levels (p.(Gly2Ser), p.(Pro60=), p.(Ser129Leu), c.1255-41C>G and c.*1530+786G>A).

3.Introducción

3.1. Enfermedades cardiovasculares

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la principal causa de mortalidad y morbilidad global tanto en hombres como mujeres, siendo su prevalencia en adultos mayores de 20 años de un 49,2% ¹. Se ha descrito como principal factor de riesgo de estas afecciones un nivel elevado colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDLc) ²⁻⁴. En contraposición, numerosos estudios han establecido que niveles altos de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (HDLc) correlacionan inversamente con el riesgo de sufrir ECV ^{5,6}. Se ha descrito que dicha relación es debida al papel que estas partículas HDL juegan en el transporte reverso de colesterol (TRC) desde los tejidos periféricos al hígado, para su excreción en la bilis ^{7,8}. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la relación entre los niveles de HDLc y el riesgo de sufrir ECV se ajusta mejor a un modelo en forma de U: tanto los valores extremadamente bajos como los excesivamente elevados se corresponden con los mayores índices de mortalidad por ECV ^{9,10}. Estas conclusiones apoyan la hipótesis de que la funcionalidad de la HDL es más significativa que la concentración total de HDLc como factor ateroprotector. Como pieza clave en el metabolismo de las HDL, se identificó en 1996 el receptor scavenger de clase B, tipo I (SR-B1), con gran afinidad por estas partículas de alta densidad, que permite la internalización selectiva, no mediada por endocitosis, de los ésteres de colesterol (EC) transportados por las HDL, principalmente en tejidos esteroideogénicos no placentarios para la síntesis de hormonas, así como el intercambio de colesterol entre tejidos periféricos e hígado, como parte del TRC ¹¹.

3.2. El receptor SR-B1

El receptor SR-B1 es un miembro de la clase B de la familia de receptores scavenger, en la que se incluyen otras glicoproteínas de membrana como su variante de splicing, el receptor scavenger de clase B, tipo II (SR-B2, también llamado CD36), con una cola citoplasmática (C-terminal) distinta, o la proteína lisosomal integral de membrana 2 (LIMP-2) ^{12,13}. En humanos, el receptor SR-B1 está codificado por el gen *SCARB1*, que se sitúa en el cromosoma 12 y se compone de 13 exones y 12 intrones, sumando un total de 86 kb ¹⁴.

El producto génico principal del gen *SCARB1*, la isoforma 1, es una proteína de 509 aminoácidos (aa), cuyo peso molecular final, tras modificaciones postraduccionales, es de 82 kDa ¹⁴. Al igual que otros miembros de la familia, el receptor SR-B1 contiene dominios N-terminal (aa 1-11) y C-terminal (aa 462-509) cortos, dos regiones transmembrana (aa 12-32 y 441-461) y un último dominio extracelular que representa la mayor parte de la proteína (aa 33-440), conteniendo una región rica en cisteínas y múltiples sitios de N-glicosilación ^{13,14}. Se ha demostrado que algunas de estas características estructurales tienen gran relevancia en la funcionalidad de la proteína. Así, el motivo de dimerización de glicina de la región transmembrana N-terminal, es imprescindible para la oligomerización del receptor y el transporte de lípidos ¹²⁻¹⁴. Del mismo modo, la región C-terminal contiene un dominio de interacción con la proteína adaptadora con dominio de PDZ 1 (PDZK1), que juega un papel importante en la vía de señalización del receptor y en la regulación postranscripcional ¹³. Por su parte, siete residuos de cisteína que aparecen muy conservados evolutivamente en el dominio extracelular, son requeridos para la unión del receptor a las HDL, la captación selectiva de EC y el tráfico de la proteína hacia la superficie celular ¹⁴.

En cuanto a su localización tisular, SR-B1 se expresa mayoritariamente en las células parenquimales del hígado, así como en las células esteroideogénicas de la glándula adrenal y las gónadas ¹²⁻¹⁴. Sin embargo, esta proteína se expresa también en otros tipos celulares como adipocitos, macrófagos, células endoteliales y plaquetas ³.

3.3. SR-B1 en el metabolismo de las lipoproteínas

A pesar de que SR-B1 es ampliamente conocido por su capacidad de mediar la captación selectiva de EC de las HDL por parte de las células, este receptor interviene en la internalización de otras moléculas lipídicas, tales como colesterol libre, triglicéridos (TG) y fosfolípidos ¹²⁻¹⁴. Además, puede actuar como receptor de otras lipoproteínas proaterogénicas entre las que se incluyen la lipoproteína a (Lp(a)), la LDL, y la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), aunque tienen una menor afinidad que las HDL ¹³. El posible mecanismo por el que lleva a cabo esta función se ha dividido en tres pasos. En primer lugar, se da la unión de la partícula rica en colesterol al dominio extracelular de SR-B1 y, a continuación, se produce el transporte a favor de gradiente de los EC desde la lipoproteína hacia la membrana plasmática de la célula aceptora; por último, la partícula, ahora empobrecida en EC, se libera del receptor y vuelve a la circulación ^{13,14}. Cabe destacar que, algunos de los motivos estructurales descritos anteriormente tienen una clara relación con este mecanismo de actuación: la región extracelular del receptor resulta imprescindible para el reconocimiento de las lipoproteínas y la oligomerización de SR-B1, el dominio de dimerización de glicina situado en la porción N-terminal, facilita el transporte de los lípidos entre la partícula donadora y el receptor ¹⁴. Sin embargo, el mecanismo preciso por el que SR-B1 transporta los EC a la membrana plasmática no se conoce con precisión. Se ha propuesto que el dominio extracelular del receptor formaría un canal hidrofóbico que conectaría la lipoproteína con la membrana celular, de forma que los EC podrían difundir por gradiente de concentración hacia la célula. La publicación de la estructura por cristalografía de alta resolución del dominio extracelular de la proteína perteneciente a la misma familia, LIMP-2, y los estudios de modelización estructural de SR-B1 apoyan esta teoría ^{13,14}.

Además de su acción como mediador para la internalización selectiva de EC por parte de las células, también es muy relevante la implicación de SR-B1 en el TRC. En este proceso, el exceso de colesterol libre de los tejidos periféricos, como células endoteliales o macrófagos, se moviliza vía HDL al hígado para su excreción, producción de ácidos biliares o transporte a órganos esteroideogénicos para la síntesis de hormonas ¹⁴. En estos procesos se implican, además de SR-B1, dos receptores: el primero, cassette de unión a ATP A1 (ABCA1), para el eflujo unidireccional de colesterol y fosfolípidos a las apolipoproteínas A-1 y E (apoA-1 y apoE), y el segundo, cassette de unión a ATP G1 (ABCG1), que interviene en el eflujo, también unidireccional, de colesterol a las partículas nacientes de HDL ^{13,14}.

3.4. SR-B1 y su papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

Numerosos estudios han relacionado diversos mecanismos de actuación de SR-B1 con su rol en la aterosclerosis. Como se ha comentado anteriormente, el receptor SR-B1 juega un papel fundamental en la homeostasis del colesterol a través del TRC ^{3,4}. Mediante este mecanismo, la presencia del receptor SR-B1 en macrófagos y células endoteliales permite el eflujo de colesterol de las células, que se incorpora en pequeñas partículas de HDL; estas partículas pueden ser captadas selectivamente por el hígado, también a través de SR-B1, y transformadas a ácidos biliares para su excreción, y, además, las partículas de HDL también pueden oxidarse e interactuar con las plaquetas, modulando su agregación y disminuyendo con ello el riesgo de trombosis ^{3,4,15}. Así mismo, SR-B1 toma parte también en el aclaramiento hepático de las lipoproteínas proaterogénicas formadas por apolipoproteína B (apoB): VLDL, LDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), Lp(a) y quilomicrones, pero permite su internalización por parte de los macrófagos, favoreciendo la formación de las células espumosas características de las lesiones ateroscleróticas (Ilustración 1) ^{3,4,15,16}.

Sin embargo, SR-B1 en macrófagos también interviene en la regulación de la inflamación al activar la señalización por Akt y reducir la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), de forma que promueve la secreción de citoquinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento tisular β (TFG- β) ⁴. Del mismo modo, en células endoteliales limita la respuesta inflamatoria modulando la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la expresión de la enzima antioxidante 3-beta-hidroxiesteroide-delta 24-reductasa (DHCR24) ^{4,17}. En las placas ateroscleróticas, la expresión de SR-B1 puede modificar el flujo de colesterol entre células y HDL para limitar la formación de células espumosas, reduciendo la lesión ^{4,17}. Se ha demostrado en estudios recientes que la expresión del receptor disminuye la muerte por apoptosis y necrosis y su expresión en macrófagos media la eferocitosis de células apoptóticas de las lesiones ⁴. Otros mecanismos propuestos son su contribución a la ateroprotección mediada por α -tocoferol y su influencia en el suministro de oxígeno arterial, controlando la maduración de los eritrocitos como prevención de anemia ¹⁷.

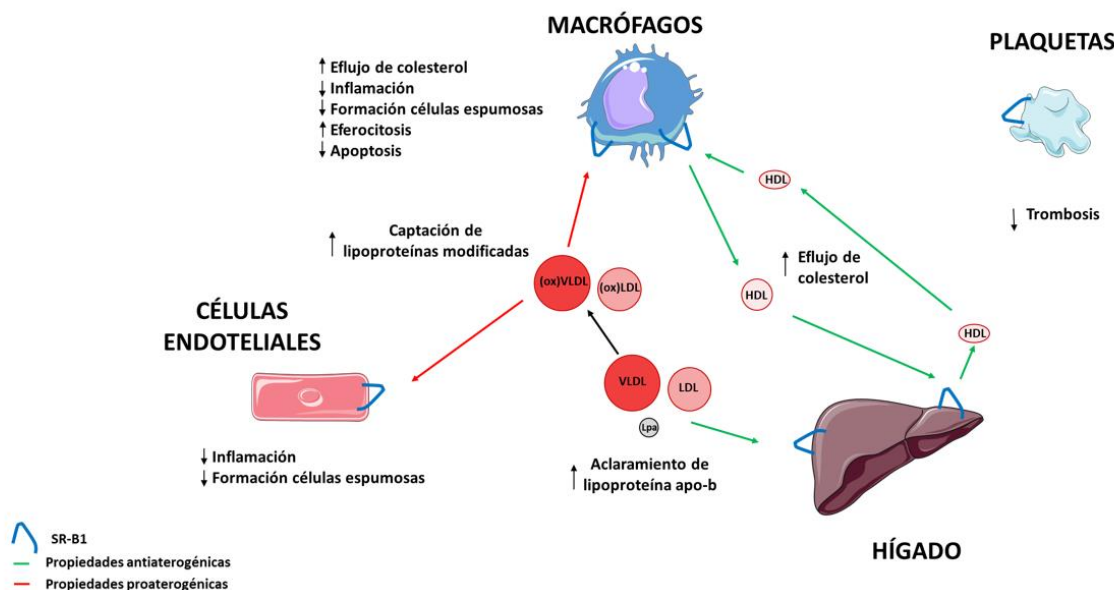


Ilustración 1. El rol de SR-B1 en la progresión de la aterosclerosis.

Modificado de Gracia-Rubio et al., 2021 (16). LDL, lipoproteína de baja densidad; Lp(a), lipoproteína (a); VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; ↑ aumento; ↓ descenso.

3.5. Variantes genéticas de SR-B1

La gran implicación de SR-B1 en la prevención de ECV ha motivado numerosos estudios para la identificación de variantes del gen *SCARB1* y su relación con el fenotipo en cuanto a los perfiles de lípidos en plasma y riesgo de sufrir ECV. En uno de los primeros proyectos al respecto se analizaron polimorfismos de conformación de cadena simple en hombres españoles caucásicos, encontrándose cinco variantes: en los intrones 5 (c.726+54C>T) y 10 (c.1255-41C>G) y en los exones 1 (p.Gly2Ser), 3 (p.Val135Ile) y 8 (p.Ala350=); la variante p.(Gly2Ser), del primer exón, se asoció con mayores niveles de HDLc y menores de LDLc y TG, así como un menor índice de masa corporal (IMC) en los individuos portadores ^{13,18}. Estudios posteriores, como el de Framingham y Rancho Bernardo, ampliaron los criterios de selección de pacientes, incluyendo mujeres, mayor variabilidad étnica y pacientes con diabetes, hipercolesterolemia familiar heterocigota o aterosclerosis subclínica ¹³. Más recientemente se identificó en un paciente con niveles elevados de HDLc y Lp(a) la variante p.(Ser129Leu) y ensayos *in vitro* posteriores confirmaron una funcionalidad disminuida de esta variante del receptor ^{13,19}. En otro estudio con individuos caucásicos con niveles extremadamente elevados de HDLc se encontró la mutación con cambio de aminoácido p.(Pro297Ser), que también resulta en una pérdida de funcionalidad del receptor; en este caso, se encontró en los sujetos de una familia que, además de la elevación de HDLc, mostraban una reducción de la síntesis de hormonas esteroideas y un menor eflujo del colesterol de los macrófagos, pero no se encontró en estos individuos un mayor riesgo de sufrir aterosclerosis ^{13,20,21}. Del mismo modo, el análisis de individuos con muy altas concentraciones de HDLc permitió la

identificación de la mutación p.(Pro376Leu) en un paciente homocigoto ^{13,22}. Para analizar los efectos de esta variante, se estudió una cohorte compuesta por individuos con ECV y sanos, en la que se encontró que los portadores de la mutación p.(Pro376Leu), incluso en heterocigosis, eran más propensos a padecer ECV; además, estudios *in vitro* de la funcionalidad de esta variante del receptor en células tipo hepatocitos han demostrado la ausencia de la función de internalización selectiva de EC ^{13,20,23}. En otro estudio independiente con individuos caucásicos con niveles de HDLc extremos, se identificaron las variantes p.(Ser112Phe) y p.(Thr175Ala), ambas asociadas con la elevación de HDLc en sujetos heterocigotos ^{7,13}. Múltiples estudios de asociación de genoma completo (GWAS) involucrando a más de 20 000 individuos de ascendencia europea han identificado más de 30 loci relacionados con las concentraciones séricas de lípidos; entre ellos, los polimorfismos c*1540G>A y c*1540G>T del gen *SCARB1*, relacionado con los niveles de HDL, de importancia clínica ²⁴. A raíz de estos descubrimientos, se ha llevado a cabo un estudio GWAS de la población islandesa centrado en el análisis de los polimorfismos del gen *SCARB1*, en el que se encontraron tres mutaciones (p.(Gly319Val), p.(Val111Met) y p.(Val32Met)) asociadas en conjunto con aumentos de HDLc similares a los observados en algunos polimorfismos descritos previamente (p.(Pro297Ser), p.(Pro376Leu), p.(Ser112Phe) y p.(Thr175Ala)), pero sin relación con mayor riesgo de ECV; además de estas, se identificaron las variantes c.127-22545G>T, intrónica, y p.(Val135Ile), ambas asociadas también con mayores niveles HDLc pero sin efecto en el riesgo de ECV ⁸.

Muchos otros estudios se han llevado a cabo hasta la fecha y, actualmente se encuentran recogidas en la base de datos Ensembl más de 29 000 variantes del gen.

Tabla 1. Algunas variantes del gen *SCARB1* y sus efectos en los individuos portadores.

Variante	Cambio de nt	Cambio de aa	Sujetos de estudio	Efecto de la variante	Referencias
rs4238001	c.4G>A	p.(Gly2Ser)	Españoles caucásicos	Aumento de HDLc Disminución de LDLc, TG, e IMC	[18]
rs5891	c.403G>A	p.(Val135Ile)	Españoles caucásicos Población islandesa	Aumento de HDLc Sin mayor riesgo de ECV	[8, 18]
rs5888	c.1050T>C	p.(Ala350=)	Españoles caucásicos	Disminución de LDLc	[18]
rs150222965	c.386C>T	p.(Ser129Leu)	Individuos con niveles de HDLc extremos	Aumento de HDLc y Lp(a) Funcionalidad disminuida del receptor	[19]
rs387906791	c.889C>T	p.(Pro297Ser)	Individuos caucásicos con niveles de HDLc elevados	Aumento de HDLc Pérdida de funcionalidad del receptor Reducción de la síntesis de hormonas esteroideas y eflujo de colesterol Sin mayor riesgo de aterosclerosis	[21]
rs74830677	c.1127C>T	p.(Pro376Leu)	Individuos con niveles de HDLc elevados	Mayor riesgo de ECV Pérdida de la internalización selectiva de colesterol	[22]
rs397514572	c.335C>T	p.(Ser112Phe)	Individuos caucásicos con niveles de HDLc extremos	Aumento de HDLc	[7]
rs187831231	c.523A>G	p.(Thr175Ala)	Individuos caucásicos con niveles de HDLc extremos	Aumento de HDLc	[7]
rs150728540	c.956G>T	p.(Gly319Val)	Población islandesa	Aumento de HDLc	[8]
rs5890	c.331G>A	p.(Val111Met)		Sin mayor riesgo de ECV	
rs771247110	c.94G>A	p.(Val32Met)			

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en identificar las variantes genéticas del gen *SCARB1*, que codifica para el receptor SR-B1, en individuos con dislipemia de etiología desconocida y analizar su relación con los niveles de HDLc. Dado que se ha establecido que las concentraciones de colesterol transportado por estas lipoproteínas están relacionadas según un modelo en forma de U con el índice de mortalidad por ECV, también estudiamos la implicación de los polimorfismos identificados en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

5. Materiales y métodos

5.1. Selección de sujetos

Se seleccionaron sujetos no relacionados con valores de colesterol HDL por encima del percentil 95 (n=59) y por debajo del percentil 5 (n=37) ajustados por edad y por sexo, provenientes de la Unidad clínica y de investigación en Lípidos y Arterioesclerosis del Hospital Universitario Miguel Servet, siguiendo las indicaciones del estudio DRECE (Tabla 2) ²⁵.

Tabla 2. Percentiles de la concentración de colesterol de HDL (HDLc) de la población española, por sexo y grupos de edad (valores en mg/dL).

	Percentil 5	Percentil 10	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Percentil 90	Percentil 95
Mujeres (edad en años)							
5-12	39	43	49	58	67	76	81
13-19	40	43	49	57	65	72	78
20-29	38	42	48,5	57	66	77	82
30-39	38	42	49	58	67	75	81
40-49	39	43	49	57	69	80	85
50-59	40	44	50	59	69	80	84
Varones (edad en años)							
5-12	40	44	53	61	70	79	83
13-19	35	37	43	50	58	64	69
20-29	33	36	41	48	56	64	70
30-39	32	34	39	46	54	64	70
40-49	31	33	39	46	56	65	70
50-59	31	35	41	50	60	70	78
Total	35	39	45	54	64	73	80

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Índice de masa corporal (IMC) $> 27,5 \text{ kg/m}^2$
- Estudio genético positivo
- Niveles de TG superiores a 200 mg/dL
- Insuficiencia renal crónica (filtrado glomerular $< 30 \text{ mL/min}$); síndrome nefrótico; hipotiroidismo (hormona tiroidea (TSH) $> 6 \text{ mg/mL}$); enfermedad hepática (alanina transaminasa (ALT) > 3 veces el valor normal); colestasis (bilirrubina directa $> 2 \text{ mg/dL}$)
- Diabetes mal controlada (Hemoglobina glicosilada (HbA1c $> 7\%$))
- Consumo de alcohol superior a 40 gramos al día
- Sujetos no relacionados

5.2. Parámetros clínicos y antropométricos

Se tomaron las medidas de altura y peso de los sujetos seleccionados y se calculó su índice de masa corporal (IMC) como el peso dividido entre el cuadrado de la altura, expresado en kg/m^2 . Se registró también su sexo y si habían sido previamente diagnosticados de hipertensión, diabetes o enfermedad cardiovascular.

5.3. Análisis bioquímico

Se recogieron muestras de sangre en tubos con EDTA de los pacientes en ayuno nocturno. El plasma se separó por centrifugación para el análisis. Las concentraciones de triglicéridos y colesterol total se analizaron por ensayos enzimático-colorimétricos estandarizados. Los niveles de HDLc se determinaron tras la precipitación del resto de lipoproteínas con sulfato de dextrano y cloruro de magnesio, y la concentración de LDLc se calculó usando la fórmula de Friedwald. Las apolipoproteínas A1 y B se analizaron por inmunonefelometría y la Lp(a) se determinó por inmunoturbidimetría. Se realizaron también ensayos fotométricos estandarizados para determinar las actividades enzimáticas de la gamma glutamil transferasa (GGT) y la transaminasa glutámico-pirúvica (GPT). La glucemia se determinó por ensayos enzimático-colorimétricos y se realizó también el ensayo inmunoturbidimétrico de la hemoglobina glicosilada (HbA1c). Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet.

5.4. Obtención del DNA genómico

El DNA genómico de la muestra se aisló a partir de 10 mL de sangre periférica recogida sobre tubos con EDTA mediante el producto comercial Flexigene® DNA (Quiagen). Las alícuotas de DNA obtenidas se almacenaron a -80°C en ultra congeladores (Sanyo).

Tras obtener el DNA, se analizó la concentración y pureza mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). La cantidad de DNA obtenida se calculó por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

La calidad de la muestra se evaluó también a partir del coeficiente de la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm, siendo la ratio deseable próximo a 1,8. Posteriormente, se llevó el DNA a una concentración 100 ng/μL diluyéndolo con TE 0.1X. El TE 0.1X se preparó a partir de 1,211 g de Trizma ® Base (Sigma-Aldrich) y 0,336 g de EDTA-Na₂ (Sigma-Aldrich) en 900 mL de agua, ajustándose el pH a 8 mediante la adición de ácido clorhídrico, se conservó a 4°C y posteriormente se realizó una dilución 1:10 que se conservó a -20 °C. Este procedimiento se llevó a cabo por el servicio de genómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

5.5. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores para secuenciar el gen *SCARB1* se realizó mediante el programa Primer3²⁶ utilizando la secuencia referencia del gen *SCARB1* del Ensembl (www.ensembl.org). Posteriormente se realizó un análisis de los cebadores diseñados utilizando el programa OligoAnalyzer²⁷.

Cuando se diseñan cebadores hay que tener en cuenta diferentes factores:

- Longitud: el cebador debe contener entre 18 y 24 nucleótidos.
- Temperatura de Melting (TM): la TM debe ser lo más parecida posible entre el cebador directo y el cebador reverso, y la diferencia entre ambas debe ser máximo de 2°C. Esta temperatura viene determinada por la longitud y los nucleótidos que componen el cebador.
- Porcentaje de guaninas y citosinas en su composición: este porcentaje debe situarse entre el 50 y 60% para asegurar una unión estable entre el cebador y la secuencia de DNA.
- Evitar varias G/C en el extremo 3', ya que esto generaría la unión estable a otras secuencias, disminuyendo la especificidad.
- Formación de homodímeros: viene dada por la complementariedad intra-primer, es decir, la estructura de doble cadena resultante del plegamiento del primer sobre sí mismo que debe evitarse para aumentar la unión del primer con el DNA.
- Formación de heterodímeros: viene dada por la complementariedad entre ambos primers, y también se debe evitar para que si no disminuya la eficiencia con la que el cebador se une al DNA.

Se diseñó cada pareja de cebadores (directo y reverso) para cada exón del gen *SCARB1* generando siempre secuencias de menos de 1000 pares de bases (pb) para que estas puedan ser secuenciadas posteriormente por el método Sanger.

5.6. Amplificación por PCR del gen de estudio

La reacción de PCR se llevó a cabo sobre el DNA genómico extraído de cada paciente, en un volumen reacción total de 20 μL (Tabla 3). Para ello, sobre 1 μL de DNA (100 ng/ μL) se añaden 19 μL del mix de PCR: 13,5 μL H_2O (Meinsol inyectable), 2 μL buffer de reacción (10X) (BioTaq \textregistered DNA polymerase BIO-21040, Meridian bioscience), 0,6 μL MgCl_2 (50 mM) (BioTaq \textregistered DNA polymerase BIO-21040, Meridian bioscience), 2 μL dNTPs (2 mM), 0,4 μL primer F (10 μM), 0,4 μL primer R (10 μM) y 0,12 μL Taq polimerasa (5 U/ μL) (BioTaq \textregistered DNA polymerase BIO-21040, Meridian bioscience). El mix de reacción para el exón 1 y la región 3 del promotor la cantidad de H_2O se reduce a 9,5 μL y se añaden 4 μL de solución de betaína (5 M) (PCR Reagent B0300-1VL, Sigma-Aldrich) para facilitar la separación de las hebras de DNA, con regiones ricas en GC, y su amplificación. Se prepara también el control negativo, solo con el mix, sin DNA.

Tabla 3. Cantidades y concentraciones finales empleados en la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad (μL)	Concentración final
DNA genómico (100 ng/ μL)	1	5 ng/ μL
H_2O	13,5 (9,5*)	-
Buffer (10X)	2	1X
MgCl_2 (50 mM)	0,6	1,5 mM
dNTPs (2 mM)	2	200 μM
Primer F (10 μM)	0,4	200 μM
Primer R (10 μM)	0,4	200 μM
*Betaína (5 M)	4	1 M
Taq polimerasa (5 U/ μL)	0,12	0,03 U/ μL
Total	20,02	-

*La adición de betaína y la reducción de la cantidad de agua aplican únicamente para la amplificación del exón 1 y la región 3 del promotor.

La placa Labcon de 96 pocillos con la mezcla de reacción correspondiente a cada paciente y el blanco se sella para evitar la evaporación y se lleva al termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied biosystems). El programa estándar para la amplificación de los fragmentos se muestra a continuación en la Tabla 4. Los programas específicos empleados para la amplificación de cada fragmento se encuentran recogidos en la Tabla A-2 del Anexo.

Tabla 4. Programa estándar de termociclador empleado para la amplificación por PCR de cada región del gen SCARB1.

Fase de amplificación	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2'
Desnaturalización del DNA	95°C	40''
Hibridación de primers	TM	30''
Extensión de primers	72°C	30''
Extensión final	72°C	7'
Final	4°C	∞

TM: Temperatura de hibridación o melting, variable en función de la región del DNA amplificada. TM=64°C (exones 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 13), TM=60°C (exones 6, 7, 9, 11, 12), TM=67°C (exón 1), TM=57°C (región 1 del promotor), TM=56°C (región 2 del promotor) y TM=61°C (región 3 del promotor).

Los productos de PCR obtenidos se comprueban por electroforesis en gel de agarosa MS-8 (8065, Condalab) al 2% Tae 1X teñido con 1,6 µL de SYBR® safe I (S33102, Invitrogen) para visualizar el DNA. Para ello, se preparan las muestras a analizar (2 µL) con 2 µL de xileno-cianol para cada pocillo y se carga también 1 µL del marcador de peso molecular DirectLoad® PCR 100pb low ladder (D3687, Sigma-Aldrich) y el control negativo, preparado de igual forma que las muestras. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron 90V, 400 mA y 30 minutos, tras los cuales se visualiza el gel bajo luz UV y se comprueba el tamaño de los fragmentos obtenidos.

5.7. Purificación del producto mediante Exosap-IT

Los productos de PCR obtenidos se purifican por Exosap-IT® (78205.10.ML, Thermo Fisher). Para ello, se añaden 2 µL del reactivo EXOSAP diluido en agua 1/10 en placas Labcon y, sobre este, se adicionan los 5 µL de la PCR de los pacientes. La placa, una vez sellada, se incuba en el termociclador a 37°C durante 40' para permitir la degradación enzimática de los primers y nucleótidos residuales, a continuación, se sube la temperatura a 80°C durante 15' para inactivar el reactivo y se enfría a 4°C.

5.8. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se lleva a cabo en un volumen total de 10 µL en placas Ibbián protegidas de la luz. Se prepara un mix para la reacción directa (mix F) y otro para la reversa (mix R): 0,5 µL Big Dye (Kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 4337457, Thermo Fisher), 1,75 µL buffer kit Big Dye (Kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 4337457, Thermo Fisher), 4,75 µL H₂O y 1,5 µL primer F o R 2,1 µM. Las dos reacciones se llevan a cabo en placas separadas, mezclando 8,5 µL del mix correspondiente con 1,5 µL del producto de PCR purificado. Las placas selladas se introducen en el termociclador con el programa que se indica en la Tabla 5. Una vez finalizada la reacción se comienza con el protocolo de precipitación. Sobre los pocillos con 10 µL de volumen se adicionan 4 µL de EDTA 62,5 mM a pH 8,0 y se centrifuga unos segundos. Sobre esto, se añaden 60 µL de la mezcla de etanol para precipitar (6,5 mL etanol 96% (v/v), 0,75 mL H₂O y 0,25 mL buffer de acetato de sodio 3 M a pH 5,2 (567422, Sigma-Aldrich)), se mezcla por inversión de las placas y se incuban protegidas de la luz durante 15 minutos. Una vez pasado este tiempo, se centrifugan ambas placas durante 30 minutos a 2090 Xg y 4°C. Al terminar, se quitan las tapas de las placas, se invierten sobre papel y se centrifugan invertidas durante 1 minuto a 180 Xg; tras esto, se añaden 70 µL de etanol 70% (v/v) y, tras volver a cerrar las placas, se mezcla por inversión y se centrifuga 15 minutos a 2090 Xg y 4°C. Se repite de nuevo el proceso de retirar las tapas e invertir y centrifugar las placas 1 minuto a 180 Xg para obtener los pellets. Para continuar con el procedimiento, se añaden 20 µL de Hi-Di formamida a cada pocillo, se tapa, se centrifuga unos segundos y se deja incubar durante 2 minutos a 94°C en el termociclador, se enfría a 4°C lo más rápido posible y se cierran las placas para guardarlas refrigeradas en la nevera hasta que se envíen para la secuenciación en el

analizador genético 3500xL (4405633, Applied Biosystems) por electroforesis capilar, siguiendo el método de Sanger. Posteriormente, las secuencias de DNA se analizaron utilizando el programa Variant Reporter (Applied Biosystems).

Tabla 5. Programa de termociclador empleado para reacción de secuenciación del gen *SCARB1*.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	1'
Desnaturalización del DNA	96°C	10''
Hibridación de primers	55°C	5''
Extensión de primers	60°C	4'
		x 25 ciclos
Final	4°C	∞

5.9. Análisis bioinformático

Para evaluar la patogenicidad de las nuevas variantes genéticas identificadas, utilizamos PredictSNP2²⁸. Para comparar la frecuencia de las variantes identificadas con la de la población general, compilamos las frecuencias alélicas de las variantes identificadas del Proyecto 1000 Genomas²⁹. Por último, la información sobre los microARN se obtuvo de PolymiRTS Database 3.0³⁰.

5.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R Studio (versión 3.4.4), considerando valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativos. Los datos de los parámetros clínicos y antropométricos que se han tomado de los pacientes se analizan estadísticamente en relación con los niveles de HDL de cada uno, calculando el p-valor. Para las variables cualitativas (sexo, hipertensión, diabetes y enfermedad cardiovascular) se calcula el número y porcentaje de individuos con la característica en cuestión y el valor p a partir del estadístico chi cuadrado de Pearson. Para las variables cuantitativas, en primer lugar, se representa el histograma para determinar si la distribución es o no paramétrica. A continuación, para las variables paramétricas (colesterol total, colesterol LDL, glucosa y HbA1c) se calcula la media y la desviación estándar y el p-valor se determina a partir de la prueba t de Student, mientras que para el caso de las variables no paramétricas (índice de masa corporal, colesterol HDL, GGT, GPT, apolipoproteína A1, apolipoproteína B y lipoproteína a) se determina la mediana y los percentiles 25 y 75 y se realiza la prueba de Wilcoxon pareada para evaluar el p-valor.

6. Resultados

6.1. Características clínicas y bioquímicas

El análisis estadístico de los diversos parámetros estudiados nos permite establecer diferencias significativas en función de la concentración de HDLc en los dos grupos de pacientes (Tabla 6). En cuanto a las características clínicas y antropométricas analizadas, tanto el sexo como las patologías previas de diabetes e hipertensión resultan similares en los dos grupos de pacientes, lo que permite la comparación entre grupos; sin embargo, la media de edad del grupo con HDLc elevado es significativamente superior mientras que su índice de masa corporal resulta significativamente menor en comparación con los pacientes con niveles de HDLc bajos. Los análisis bioquímicos también muestran que son semejantes las actividades enzimáticas GGT y GPT, apolipoproteína B y, glucosa en sangre y el porcentaje de HbA1c, mientras la apolipoproteína A1 está más elevada en el grupo con HDL alto y los triglicéridos están significativamente aumentados en el grupo de HDLc bajo. Además, tal y como están dispuestos los grupos, las diferencias en cuanto a colesterol HDL, LDL y colesterol total son significativamente superiores en el grupo de pacientes con HDLc alto. Finalmente, cabe destacar, que el grupo de HDLc bajo tiene mayor incidencia de enfermedad cardiovascular.

Tabla 6. Características clínicas y antropométricas en función de los niveles de HDL.

	HDL alto (n=59)	HDL bajo (n=37)	p
Edad, años	54,0 (46,5 – 61,0)	37 (26 – 55)	<0,001
Hombres, n (%)	29 (30,20%)	17 (17,70%)	0,923
Índice de masa corporal, kg/m²	24,08 (22,21 – 25,01)	25,51 (23,06 – 26,47)	0,007
Triglicéridos, mg/dL	83,0 (69,0 – 108,5)	101 (76 -145)	0,037
Colesterol total, mg/dL	300,41 ± 49,83	207,16 ± 59,04	<0,001
Colesterol HDL, mg/dL	92,0 (82,5 – 100,5)	33 (30 - 37)	<0,001
Colesterol LDL, mg/dL	188,46 ± 41,40	150,64 ± 55,72	<0,001
GGT, UI/L	22,0 (15,0 – 27,5)	17,0 (13,0 – 27,5)	0,244
GPT, UI/L	19,0 (16,5 – 25,0)	20,0 (14,5 – 28,5)	0,762
Apolipoproteína A1, mg/dL	215,0 (197,0 – 246,5)	110 (104 -120)	<0,001
Apolipoproteína B, mg/dL	126,50 (109,25 – 148,50)	106,0 (89,2 -141,0)	0,056
Lipoproteína (a), mg/dL	29,0 (15,8 – 101,0)	24,20 (7,93 – 44,65)	0,106
Glucosa, mg/dL	89,12 ± 10,76	90,68 ± 16,41	0,611
HbA1c, %	5,42 ± 0,36	5,35 ± 0,45	0,480
Hipertensión, n (%)	7 (7,52%)	4 (4,30%)	1
Diabetes, n (%)	1 (1,04%)	4 (4,17%)	0,138
Enfermedad cardiovascular, n (%)	0 (0,00%)	6 (6,45%)	0,004

HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; GGT, glutamil transferasa; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; HbA1c, hemoglobina glicosilada.

Variables cualitativas (sexo, hipertensión, diabetes y enfermedad cardiovascular), cálculo del número y tanto por ciento de individuos con la característica, estadístico chi cuadrado de Pearson para determinar el p-valor. **Variables cuantitativas paramétricas** (colesterol total, colesterol LDL, glucosa y HbA1c), cálculo de la media y la desviación estándar, prueba t de Student para obtener el p-valor. **Variables cuantitativas no paramétricas** (índice de masa corporal, colesterol HDL, GGT, GPT, apolipoproteína A1, apolipoproteína B y lipoproteína a), determinación de la mediana y los percentiles 25 y 75, prueba de Wilcoxon pareada para evaluar el p-valor.

6.2. Variantes del gen *SCARB1*

Se identificaron veinticinco variantes del gen *SCARB1* en los sujetos estudiados, que se encuentran recogidas en la Tabla 7. Dos de las cuales no se han descrito con anterioridad, una sustitución de guanina por timina en la región no codificante 5' UTR (c.-177G>T) y un cambio en el tercer exón de la citosina 353 por guanina, lo que supone un cambio de treonina por serina en la posición 118 de la proteína (p.(Thr118Ser)), ambas patogénicas según los análisis bioinformáticos, con probabilidades de 97 y 87%, respectivamente. Curiosamente, ambas variantes se han encontrado únicamente en los pacientes con niveles de HDL elevados de nuestro estudio.

Otros cinco polimorfismos ya descritos suponen un cambio de aminoácido. La sustitución de guanina por adenina en la posición 2 del primer exón se traduce en un cambio de la glicina 2 por serina (p.(Gly2Ser)) y el cambio en el tercer exón de la citosina 386 por timina, modifica el aminoácido 129 de la proteína, que pasa de serina a leucina (p.(Ser129Leu)), se prevén neutrales según los análisis bioinformáticos y las frecuencias alélicas en nuestros pacientes de estudio resultan significativamente mayores que las establecidas para la población general en el Proyecto de los 1000 Genomas, encontrándose p.(Ser129Leu) en pacientes con HDL elevado y p.(Gly2Ser) en los dos grupos de sujetos. También se prevén neutrales los cambios en el exón 3 del nucleótido guanina 403 por adenina, con cambio en la proteína de valina 135 por isoleucina (p.(Val135Ile)) así como la guanina que ocupa el lugar de la citosina en la posición 158 en el exón 4 supone un cambio de aminoácido 158 de la proteína, que pasa de isoleucina a metionina; p.(Ile158Met) se encontró en individuos con niveles bajos de HDL, mientras que p.(Val135Ile) aparecía también en sujetos con los concentraciones de HDL más elevadas. Por último, la sustitución en el noveno exón de la citosina 1133 por metionina supone un cambio de la secuencia de la proteína en la posición 378, donde la treonina se sustituye por metionina (p.(Thr378Met)), se identificó en los pacientes con concentraciones de HDL elevadas y se predice como variante deletérea con una probabilidad del 82%.

Dos últimas variantes en las regiones codificantes del segundo y octavo exón no suponen cambio en la secuencia de la proteína. El polimorfismo del segundo exón consiste en un cambio de la timina 180 por citosina, manteniéndose la prolina codificada en la posición 60 de la proteína (p.(Pro60=)), también se encontró en los individuos con las HDL elevadas del estudio, con frecuencias alélicas significativamente superiores a las identificadas en el Proyecto de los 1000 Genomas,

sin predecirse efectos patogénicos. Por su parte, la sustitución también de timina por citosina, esta vez en la posición 1050 (p.(Ala350=)), tampoco afecta al aminoácido 350 alanina ni se esperan efectos deletéreos, pero en este caso se encuentra la variante en ambos grupos de nuestro estudio y sin diferencias significativas con las frecuencias alélicas en la población general.

Se encontraron también, además del polimorfismo no descrito con anterioridad, otros cinco polimorfismos en la región promotora del gen, todos ellos con predicciones bioinformáticas de efectos neutrales. Una de estas variantes se identificó únicamente en el grupo de sujetos con los niveles de HDL elevados: la sustitución en la posición 1371 antes del inicio de la traducción de timina por citosina (c.-1371T>C). Por su parte, las cuatro modificaciones restantes se encuentran sin diferencias significativas en ambos grupos de pacientes: dos cambios de citosina por timina en las posiciones -1253 (c.-1253C>T) y -1214 (c.-1214C>T), un cambio de la adenina -1108 por guanina (c.-1108A>G) y una sustitución del nucleótido -408 que pasa de citosina a guanina (c.-408C>G).

En cuanto a las variantes intrónicas, solo una de ellas se espera deletérea con una probabilidad del 91%: la sustitución de guanina por adenina en la posición 843-982 del sexto intrón (c.843-982G>A); en concreto, esta modificación la encontramos entre los pacientes con los niveles de HDL más reducidos. En este mismo grupo de sujetos se identificaron también dos variantes cuya predicción bioinformática indica efectos neutrales; en el sexto intrón, la timina que reemplaza a la citosina en 843-173 (c.843-173C>T) y, en el intrón doce, la adenina que sustituye a la guanina situada en la posición 1530+786 (c.*1530+786), siendo las frecuencias encontradas en nuestra población de estudio para esta última variante significativamente mayores que las determinadas en el Proyecto de los 1000 Genomas. De la misma forma, un polimorfismo neutral en el décimo intrón aparece con mayor frecuencia en nuestro grupo de pacientes, sin embargo, en este caso se trata de un cambio de citosina por guanina en la posición 1255-41 (c.1255-41C>G) que encontramos tanto en voluntarios con niveles de HDL altos como bajos. También en ambos grupos de individuos se encontraron otras tres variantes sin efectos patogénicos: en el intrón dos cambia una guanina por adenina en la posición 285-170 (c.285-170G>A), en el intrón cinco hay una sustitución de citosina por timina en la posición 726+54 (c.236+54C>T) y en el intrón once un cambio de timina por citosina en 1401+130 (c.1401+130T>C). Por el contrario, dos variantes neutrales se identificaron únicamente en el grupo de pacientes con HDL elevado: la sustitución de citosina por timina 1203-138 del noveno intrón (c.1203-138C>T) y el cambio situado en la posición 1401+164 del decimoprimer intrón de guanina por adenina (c.1401+164G>A).

Además, dos variantes de la región 3' UTR están asociadas con microRNAs que podrían estar afectando a la expresión del gen. La timina que sustituye a la citosina 49 del 3' UTR (c.*49C>T) no se predice deletérea, pero la encontramos en exclusiva en los pacientes con HDL elevado. Por su parte, el cambio de la guanina 94 del 3' UTR por adenina (c.*94G>A), también se predice neutral, pero en este caso aparece únicamente en los individuos con bajo HDL.

Tabla 7. Frecuencias alélicas y análisis bioinformático de las variantes de SCARB1 en sujetos con niveles extremos de HDLc.

Variante	Locali- zación	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Análisis bioinformático	Frecuencia alélica en la población de nuestro estudio y los 1000 Genomas de la población europea			Frecuencia alélica en la población de nuestro estudio		
				PredictSNP2 ²⁸ (probabilidad)	Nuestro estudio	Proyecto de los 1000 Genomas ²⁹	<i>p</i>	Sujetos con niveles altos de HDL	Sujetos con niveles bajos de HDL	<i>p</i>
rs1227265812	5'UTR	c.-1371T>C	NA	Neutral (88%)	0.01	NR	-	0.017	0.000	0.260
rs36226544	5'UTR	c.-1253C>T	NA	Neutral (88%)	0.302	0.331	0.433	0.347	0.230	0.083
rs36226283	5'UTR	c.-1214C>T	NA	Neutral (88%)	0.302	0.331	0.433	0.331	0.257	0.278
rs112822039	5'UTR	c.-1108A>G	NA	Neutral (88%)	0.016	0.014	0.855	0.0170	0.140	0.852
rs551998063	5'UTR	c.-408 C>G	NA	Neutral (74%)	0.005	0.002	0.413	0.008	0.001	0.427
No descrita previamente	5'UTR	c.-177G>T	NA	Patogénica (97%)	0.005	NR	-	0.008	0.000	0.427
rs4238001	Exón 1	c.4G>A	p.(Gly2Ser)	Neutral (65%)	0.219	0.116	<0.001	0.195	0.257	0.313
rs143093152	Exón 2	c.180T>C	p.(Pro60=)	Neutral (96%)	0.005	0.000	0.022	0.008	0.000	0.427
rs4765615	Intrón 2	c.285-170G>A	NA	Neutral (73%)	0.563	0.508	0.166	0.576	0.541	0.627
No descrita previamente	Exón 3	c.353C>G	p.(Thr118Ser)	Patogénica (87%)	0.005	NR	-	0.008	0.000	0.427
rs150222965	Exón 3	c.386C>T	p.(Ser129Leu)	Neutral (89%)	0.005	0.000	0.022	0.008	0.000	0.427
rs5891	Exón 3	c.403G>A	p.(Val135Ile)	Neutral (89%)	0.031	0.015	0.114	0.034	0.027	0.790
rs371778051	Exón 4	c.474C>G	p.(Ile158Met)	Neutral (89%)	0.005	NR	-	0.000	0.014	0.205
rs61932577	Intrón 5	c.726+54C>T	NA	Neutral (74%)	0.012	0.094	0.279	0.093	0.162	0.152
rs182346713	Intrón 6	c.843-173C>T	NA	Neutral (77%)	0.010	0.003	0.143	0.000	0.027	0.072
rs1302998758	Intrón 6	c.843-982G>A	NA	Patogénica (91%)	0.005	NR	-	0.000	0.014	0.205

rs5888	Exón 8	c.1050T>C	p.(Ala350=)	Neutral (96%)	0.599	0.542	0.144	0.593	0.608	0.837
rs748231262	Exón 9	c.1133C>T	p.(Thr378Met)	Patogénica (82%)	0.005	NR	-	0.008	0.000	0.427
rs573706452	Intrón 9	c.1203-138C>T	NA	Neutral (88%)	0.005	NR	-	0.001	0.000	0.427
rs838897	Intrón 10	c.1255-41C>G	NA	Neutral (74%)	0.089	0.052	0.045	0.110	0.054	0.183
rs2293440	Intrón 11	c.1401+130T>C	NA	Neutral (88%)	0.047	0.032	0.292	0.059	0.027	0.303
rs756206185	Intrón 11	c.1401+164G>A	NA	Neutral (73%)	0.005	NR	-	0.008	0.000	0.427
rs75446635	Intrón 12	c.*1530+786G>A	NA	Neutral (88%)	0.005	0.000	0.022	0.000	0.014	0.206
rs10396214	3'UTR	c.*49C>T	NA	Neutral (89%)	0.005	0.007	0.785	0.001	0.000	0.427
rs701103	3'UTR	c.*94G>A	NA	Neutral (89%)	0.005	0.001	0.189	0.000	0.014	0.206

Variante	MicroRNAs ³⁰			
rs10396214	hsa-miR-4640-5p	hsa-miR-4726-5p	hsa-miR-6762-5p	hsa-miR-6845-5p
rs701103	hsa-miR-3120-5p	hsa-miR-346	hsa-miR-3692-5p	hsa-miR-4288
	hsa-miR-4731-5p	hsa-miR-5589-5p	hsa-miR-6071	hsa-miR-626
	hsa-miR-632	hsa-miR-6876-3p	hsa-miR-93-3p	

NR: No reportada; NA: No aplicable.

²⁸PredictSNP2 uses CADD, DANN, FATHMM y Funseq2 as predictors.

²⁹1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Books LD et al. An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes. Nature 2012, 491:56-65.

³⁰PolymiRTS Database 3.0: <http://compbio.uthsc.edu/mi>

7. Discusión

Numerosos estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de HDLc correlacionan inversamente con el riesgo de padecer ECV ⁶. Esta asociación se basa en las propiedades antiaterogénicas de las HDL, entre las que se incluyen su participación en el TRC. Las partículas HDL transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para ser metabolizado y excretado en la bilis. Además, las HDL también tienen la capacidad de transportar el colesterol de los macrófagos que se encuentran en la pared arterial ³¹. Sin embargo, estudios de randomización mendeliana ³² y estudios con intervención farmacológica ³³ no sustentan el concepto de que el HDLc pueda reducir el riesgo cardiovascular ⁸. Además, análisis retrospectivos de grandes estudios epidemiológicos muestran que los niveles plasmáticos altos de HDLc se asocian con mayor riesgo cardiovascular ⁴.

Como se ha comentado previamente, SR-B1 participa en la captación selectiva de EC de las HDL en el hígado, y también puede actuar como receptor de LDL, VLDL y Lp(a), lipoproteínas proaterogénicas ¹³. Estas propiedades confieren a SR-B1 un papel ateroprotector. Sin embargo, varios estudios han demostrado que SR-B1 favorece la captación de lipoproteínas modificadas tanto en macrófagos como en células endoteliales, favoreciendo la progresión de la aterosclerosis ^{3,4}. Estudios realizados en ratones muestran que la ausencia de SR-B1 produce una rápida progresión de la aterosclerosis, aunque los valores plasmáticos de HDLc en ratones SR-B1 knockout sean el doble que los valores plasmáticos de los ratones wildtype ^{17,34,35}. Este aumento en la progresión de la aterosclerosis en ratones SR-B1 knockout puede ser debido a una disminución en el eflujo de colesterol de los macrófagos a las HDL y a una alteración en la captación de los EC de las HDL en el hígado ³⁵. Además, los ratones deficientes en SR-B1 tienen valores elevados de colesterol total, de LDLc, de colesterol transportado por VLDL y sus HDL tienen mayor tamaño ³⁴. Efectos opuestos se han visto en ratones que sobreexpresan SR-B1. Estos ratones tienen valores plasmáticos de HDLc significativamente menores que los ratones wildtype, así como de LDLc y colesterol VLDL ³⁶⁻³⁹. Además, tienen un mayor aclaramiento de los EC transportados por las HDL ³⁶. Dado que *SCARB1* está involucrado en el metabolismo tanto de HDLc como de partículas lipídicas que contienen apoB, el objetivo de este estudio fue secuenciar el gen *SCARB1* en sujetos con valores extremos de HDLc y dislipemia de etiología desconocida.

El estudio de las características bioquímicas y antropométricas llevado a cabo en ambos grupos de sujetos de este estudio muestra diferencias significativas en función de los niveles de HDLc de los pacientes. Así, los individuos con niveles superiores de HDLc mostraron menores niveles de triglicéridos en sangre y valores de índice de masa corporal más reducidos, ambos descritos como factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular. De esta forma vemos que, además del propio papel ateroprotector que se les atribuye a las partículas de HDL, su presencia en sangre a concentraciones elevadas se relaciona también con la mejoría de otros parámetros relacionados con el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular. De hecho, el número de incidentes cardiovasculares registrados en este grupo de pacientes es

significativamente menor que los correspondientes en el grupo con niveles de HDLc reducidos, coincidiendo con las propiedades beneficiosas para la salud cardiovascular que se les atribuyen a estas partículas.

Además, no solo aparecen diferencias clínicas entre ambos grupos de sujetos del estudio, sino que las variantes polimórficas encontradas tampoco se distribuyen equitativamente en los dos grupos de pacientes. De hecho, trece de los veinticinco polimorfismos identificados en el estudio se encontraron exclusivamente en alguno de los grupos de pacientes, nueve en el grupo de HDLc alto y cuatro en el grupo de HDLc bajo. En el grupo de sujetos con niveles de HDLc elevados encontramos las variantes c.-1371T>C, c.-177G>T, p.(Pro60=), p.(Thr118Ser), p.(Ser129Leu), p.(Thr378Met), c.1203-138C>T, c.1401+164G>A y c.*49C>T. Por su parte, los polimorfismos que identificamos en el grupo con los niveles de HDLc más reducidos son p.(Ile158Met), c.843-982G>A, c.843-173C>T, c*1530+786 y c.*94G>A.

La secuenciación de los trece exones del gen *SCARB1* de los pacientes escogidos para este estudio permitió identificar un total de veinticinco variantes, dos de ellas no habían sido descritas previamente: c.-177G>T y p.(Thr118Ser). Cabe destacar que el análisis bioinformático de ambas indica posibles efectos patogénicos y, como ya hemos comentado, estos polimorfismos se encontraron exclusivamente en el grupo con niveles altos de HDLc, por lo que podrían tener un papel importante y sus efectos sobre el receptor SR-B1 y su relación con el riesgo de enfermedad cardiovascular deberían analizarse con más detalle en estudios posteriores.

La variante p.(Gly2Ser) se encontró en los dos grupos de estudio sin diferencias significativas, pero su frecuencia de aparición resulta significativamente superior en nuestro estudio que en la población general europea. Estudios previos de este cambio de aminoácido establecieron su relación con el aumento de los niveles de HDLc y la disminución de LDLc, TG e IMC en los individuos portadores ¹⁸. Sin embargo, nuestros datos indican que esta variante también estaría relacionada con los niveles extremadamente bajos de HDLc. Se han realizado estudios *in vitro* que demuestran que la presencia de esta variante conduce a una menor expresión del receptor SR-B1 al afectar a la traducción y degradación de la proteína ⁴⁰. Para el caso del polimorfismo p.(Ser129Leu), que previamente se había visto asociado a niveles elevados de HDLc y Lp(a), coincidiendo con lo observado en nuestro grupo de pacientes, los estudios *in vitro* demostraron que esta relación se debía a que el cambio de aminoácido conducía a un descenso de la funcionalidad del receptor ¹⁹. El cambio de aminoácido p.(Val135Ile) no se ha probado en ensayos a nivel de proteína, pero su presencia se ha visto relacionada con el aumento de los niveles de HDLc, sin incremento en el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular ^{8,18}. A pesar de esto, en nuestro estudio encontramos esta variante también en el grupo con niveles de HDLc reducidos.

Además de estas variantes con cambio de sentido en la proteína, encontramos también dos polimorfismos en regiones codificantes que no conllevan cambios de aminoácido: p.(Pro60=) y p.(Ala350=). Para la variante p.(Pro60=) no se han establecido relaciones con el perfil lipídico de los individuos portadores, pero en nuestro estudio la hemos encontrado únicamente en individuos con elevado HDLc, con frecuencias de aparición más altas de las que cabría esperar para la población general, por lo que este polimorfismo también podría tener relevancia clínica. Por su

parte, p.(Ala350=) ha sido ampliamente estudiada y se ha descrito su relación con niveles de LDLc menores ¹⁸, y tanto con niveles de HDLc elevados ⁴¹ como reducidos ⁴², coincidiendo con las observaciones de este estudio.

De las variantes intrónicas, solo c.843-982G>A, del sexto intrón, se prevé patogénica según el análisis bioinformático y la hemos encontrado relacionada con niveles bajos de HDLc, en el grupo con mayor número de incidentes cardiovasculares.

Los microRNAs que las predicciones bioinformáticas asocian con las variantes c.*49C>T y c*94G>A podrían estar actuando por mecanismos de ribointerferencia para regular la traducción, afectando finalmente a los niveles de SR-B1 expresado por las células, dando lugar a los fenotipos observados. Otros polimorfismos, como los hallados en la región promotora del gen, podrían influir directamente en el nivel de transcripción del gen al estar afectando a regiones o nucleótidos importantes para la regulación transcripcional.

Existen algunas limitaciones en nuestro estudio. Debido al gran tamaño del gen *SCARB1*, secuenciamos solo la región codificante y los nexos exón-intrón, además, el número de sujetos de nuestro estudio fue limitado. Es probable que hayamos pasado por alto variantes funcionales menos comunes presentes en intrones y que no hayamos identificado todas las variantes funcionales presentes en la región codificante. Asimismo, como se ha comentado anteriormente, el tamaño de la muestra en este estudio no proporcionó el poder estadístico adecuado para observar diferencias en las frecuencias alélicas entre los grupos de HDLc elevado y disminuido. A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio ha permitido identificar 2 variantes genéticas que no han sido identificadas previamente y que es necesario estudiar en profundidad para conocer si afectan a la funcionabilidad del receptor ya que los estudios bioinformáticos apuntan a que estas variantes genéticas tienen alta probabilidad de ser deletéreas.

8. Conclusiones

- Los análisis de los parámetros clínicos y antropométricos de los sujetos del estudio muestran que los sujetos con concentraciones bajas de HDLc tenían valores significativamente más altos de índice de masa corporal y triglicéridos y una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular que los sujetos con altos niveles de HDLc.
- La secuenciación del gen *SCARB1* en 96 sujetos con valores extremos de HDLc, ha reportado 25 variantes genéticas, 2 de ellas no descritas previamente (una localizada en región codificante y otra en región intrónica), 7 localizadas en la región codificante, 6 en la región del promotor, 8 en región no codificante y 2 en la región 3' UTR. Los análisis bioinformáticos han categorizado los polimorfismos c.-177G>T, p.(Thr118Ser), c.843-982G>A y p.(Thr378Met), como patogénicas.

- Hay diferencias entre los polimorfismos que se encuentran en los pacientes con niveles extremos de HDLc y la población general referida al proyecto de los 1000 genomas.
- Nuestros resultados muestran que los polimorfismos genéticos de *SCARB1* están implicadas en las concentraciones extremas de HDLc.
- Se tiene que realizar un estudio de los polimorfismos genéticos encontrados en *SCARB1* con potencial patogénico, según los análisis bioinformáticos, para conocer su implicación en la función del receptor SR-B1 y su repercusión en el metabolismo lipídico.

9. Conclusions

- Analyses of the clinical and anthropometric parameters of the study subjects show that subjects with low concentrations of HDLc had significantly higher body mass index and triglyceride values and a higher prevalence of cardiovascular disease than subjects with high levels of HDLc.
- The sequencing of the *SCARB1* gene in 96 subjects with extreme values of HDLc, has reported 25 genetic variants, 2 of them not previously described (one located in coding region and another in intronic region), 7 located in the coding region, 6 in the promoter region, 8 in non-coding region and 2 in the 3' UTR region. Bioinformatics analyses have categorized polymorphisms c.-177G>T, p.(Thr118Ser), c.843-982G>A and p.(Thr378Met), as pathogenic.
- There are differences between the polymorphisms found in patients with extreme levels of HDLc and the general population referred to the 1000 genomes project.
- Our results show that the genetic polymorphisms of *SCARB1* are involved in extreme concentrations of HDLc.
- A study of the genetic polymorphisms found in *SCARB1* with pathogenic potential according to bioinformatics analyses must be carried out to elucidate their involvement in the function of the SR-B1 receptor and their impact on lipid metabolism.

10. Bibliografía

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association. Vol. 135, *Circulation*. 2017. 146–603 p.
2. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of Coronary Heart Disease and Lipoprotein Cholesterol Levels: The Framingham Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 1986;256(20):2835–8.
3. Hoekstra M. SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease. *Atherosclerosis*. 2017;258:153–61.
4. Linton MF, Tao H, Linton EF, Yancey PG. SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Jun;28(6):461–72.
5. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2009;302(18):1993–2000.
6. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105(3):310–5.
7. Brunham LR, Tietjen I, Bochem AE, Singaraja RR, Franchini PL, Radomski C, et al. Novel mutations in scavenger receptor BI associated with high HDL cholesterol in humans. *Clin Genet*. 2011;79(6):575–81.
8. Helgadottir A, Sulem P, Thorgeirsson G, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Jensson B, et al. Rare SCARB1 mutations associate with high-density lipoprotein cholesterol but not with coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2018;39(23):2172–8.
9. Ko DT, Alter DA, Guo H, Koh M, Lau G, Austin PC, et al. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions: The CANHEART Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(19):2073–83.
10. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: Two prospective cohort studies. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2478–86.
11. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* (80-). 1996 Jan 26;271(5248):518–20.
12. Shen WJ, Hu J, Hu Z, Kraemer FB, Azhar S. Scavenger Receptor class B type i (SR-BI): A versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism*. 2014;63(7):875–86.
13. Shen WJ, Asthana S, Kraemer FB, Azhar S. Scavenger receptor B type 1: Expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1114–31.
14. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*. 2018;80(3):95–116.

15. Hoekstra M, van Berkel TJC, van Eck M. Scavenger receptor BI: A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. Vol. 16, World Journal of Gastroenterology. 2010. p. 5916–24.
16. Gracia-Rubio I, Martín C, Civeira F, Cenarro A. SR-B1, a Key Receptor Involved in the Progression of Cardiovascular Disease: A Perspective from Mice and Human Genetic Studies. *Biomedicines*. 2021 May 27;9(6):612.
17. Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1732–8.
18. Acton S, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cenarro A, et al. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(7):1734–43.
19. Yang X, Sethi A, Yanek LR, Knapper C, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, et al. SCARB1 Gene Variants Are Associated with the Phenotype of Combined High High-Density Lipoprotein Cholesterol and High Lipoprotein (a). *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9(5):408–18.
20. Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2021;116(7):1254–74.
21. Vergeer M, Korporaal SJA, Franssen R, Meurs I, Out R, Kees Hovingh G, et al. Genetic Variant of the Scavenger Receptor BI in Humans A b s t r a c t. Vol. 364, n engl j med. 2011.
22. Zanoni P, Khetarpal SA, Larach DB, Hancock-Cerutti WF, Millar JS, Cuchel M, et al. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science* (80-). 2016;351(6278):1166–71.
23. Samadi S, Farjami Z, Hosseini ZS, Ferns GA, Mohammadpour A hooshang, Tayefi M, et al. Rare P376L variant in the SR-BI gene associates with HDL dysfunction and risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2019;73(June):44–9.
24. Teslovich TM, Musunuru K, Smith A V., Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010 Aug;466(7307):707–13.
25. Gómez-Gerique JA, Gutiérrez-Fuentes JA, Montoya MT, Porres A, Rueda A, Avellaneda A, et al. Perfil lipídico de la población española: Estudio DRECE (Dieta y Riesgo de Enfermedad Cardiovascular en España). *Med Clin (Barc)*. 1999;113(19):730–5.
26. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):1–12.
27. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. [cited 2021 May 28]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
28. PredictSNP2: Unified platform for prediction of SNP effect in distinct genomic regions [Internet]. [cited 2021 May 28]. Available from: <https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/>

29. Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):56–65.
30. PolymiRTS Database [Internet]. [cited 2021 May 28]. Available from: <https://compbio.uthsc.edu/miRSNP/home.php>
31. Brunham LR, Hayden MR. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Prog Lipid Res*. 2015;58:14–25.
32. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: A mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012;380(9841):572–80.
33. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *N Engl J Med*. 2007 Nov 22;357(21):2109–22.
34. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12610–5.
35. Van Eck M, Twisk J, Hoekstra M, Van Rij BT, Van der Lans CAC, Bos IST, et al. Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23699–705.
36. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(3):721–7.
37. Ueda Y, Royer L, Gong E, Zhang J, Cooper PN, Francone O, et al. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem*. 1999;274(11):7165–71.
38. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, et al. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33398–402.
39. Varban ML, Rinninger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, et al. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4619–24.
40. West M, Greason E, Kolmakova A, Jahangiri A, Asztalos B, Pollin TI, et al. Scavenger receptor class B type i protein as an independent predictor of high-density lipoprotein cholesterol levels in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1451–7.
41. Xie L, Lv X, Sun Y, Tong Y, Zhang S, Deng Y. Association of rs5888 SNP in SCARB1 gene with coronary artery disease. *Herz*. 2019 Nov 7;44(7):644–50.
42. Wu DF, Yin RX, Hu XJ, Aung LHH, Cao XL, Miao L, et al. Association of rs5888 SNP in the scavenger receptor class B type 1 gene and serum lipid levels. *Lipids Health Dis*. 2012;11:1–14.